UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

418

G. PICCI

OSSERVAZIONI MORFO-FISIOLOGICHE SU AGROBACTERIUM TUMEFACIENS (Smith et Tow.) Conn NORMALE ED ANTIBIOTICO-RESISTENTE

Estratto dagli « *Annali della Facoltà d'Agraria* », Vol. XXI

CASA EDITRICE COMM. U. GIARDINI - PISA - VIA S. BIBBIANA, 14 BIS

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
25 APR 1961

UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

418

G. PICCI

OSSERVAZIONI MORFO-FISIOLOGICHE SU AGROBACTERIUM TUMEFACIENS (Smith et Tow.) Conn NORMALE ED ANTIBIOTICO-RESISTENTE

Estratto dagli « *Annali della Facoltà d'Agraria* », Vol. XXI

TIP. EDITRICE U. GIARDINI - PISA

Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia Agraria e Tecnica

G. Picci

OSSERVAZIONI MORFO-FISIOLOGICHE SU AGROBACTERIUM TUMEFACIENS (Smith et Tow.) Conn NORMALE ED ANTIBIOTICO-RESISTENTE

Premessa

E' ormai ben nota l'importanza, sia sul piano teorico che su quello pratico, del fenomeno dell'antibiotico-resistenza dei microrganismi. Tuttavia, mentre nella patologia animale gli studi relativi — almeno per quanto concerne la chemio-resistenza — risalgono al 1907 ([10]) tanto da aver assunto oggi uno sviluppo veramente notevole, lo stesso non si può dire nei confronti della patologia vegetale nell'ambito della quale esistono, a quanto ci risulta, pochissimi lavori.

Infatti, qualora si eccettuino le ricerche di De Ropp ([8]), di English e Halsema ([9]), di Klemmer e Coll. ([11]), di Abo El Dahab e Cox ([1]) e di Rangaswami ([17]), altro non è dato di ricordare.

Molto brevemente, De Ropp studiando 5 ceppi di *A. tumefaciens*, osservò grandi differenze nella sensibilità di questi nei confronti della streptomicina, penicillina, cloramfenicolo e clorotetraciclina. Queste diverse sensibilità non risultarono peraltro influire sulla virulenza del microrganismo in esame.

English e van Halsema dimostrarono un sensibile ritardo nell'insorgenza dell'antibiotico-resistenza, artificialmente indotta, in ceppi di *Erwinia amylovora e Xanthomonas vescicatoria* quando ossitetraciclina veniva aggiunta al mezzo già contenente streptomicina.

Klemmer e Coll. sperimentarono due ceppi di *A. tumefaciens* streptomicino e cloramfenicolo resistenti rispettivamente. Dopo aver trattato plantule di pomodoro, infettate con i patogeni, notarono una certa regressione nei tumori. Tali AA. pensarono di attribuire tale regressione più ad una diretta azione degli antibiotici sui tessuti che sui microrganismi.

Più recentemente, Abo e Coll. ottennero un ceppo di *Pseudomonas solanacearum* cloromicetino-resistente (fino a 500 γ/cc), mentre Rangaswami descriveva un ceppo di *Xanthomonas citri* ed uno di *X. malvacearum* nei quali aveva indotto la streptomicino-resistenza giungendo rispettivamente a 5000 e 2500 γ/cc.

In estensione a questi lavori, abbiamo creduto opportuno dar luogo ad una ricerca concernente alcuni aspetti del comportamento di *A. tumefaciens* in ceppi sensibili e ceppi resi antibiotico-resistenti.

Sperimentale

A. tumefaciens, della Collezione dell'Istituto, è stato reso antibiotico-resistente, previo saggio della sensibilità, ai seguenti antibiotici: ambramicina, aureomicina, terramicina, neomicina, vulcamicina, penicillina, tirotricina, bacitracina e streptomicina. Quindi sui ceppi resistenti, in comparazione con quelli sensibili, sono stati rilevati i caratteri colturali, il comportamento al Gram e le dimensioni. Inoltre è stata condotta una serie di prove fisiologiche, nonchè un ricerca in vivo sul potere patogeno del germe in rapporto all'antibiotico-resistenza.

Materiali e metodi

Il terreno di mantenimento per *A. tumefaciens* era costituito da agar-fagioli saccarosato. Le prove di sensibilità agli antibiotici sono state effettuate in piastra col metodo del « cilindretto », mentre l'antibiotico-resistenza è stata indotta mediante passaggi successivi in agar-fagioli saccarosato con quantità crescenti di antibiotico. I caratteri colturali sono stati rilevati in terreno liquido (brodo nutritivo e brodo di fagioli) e solido (agar-fagioli saccarosato). La colorazione del Gram è stata effettuata col metodo di Nyfeldt, consigliato da Dowson [6]. Le prove fisiologiche aventi carattere tassonomico sono state effettuate secondo i classici schemi della bateriologia. La ricerca della fosfatasi è stata eseguita col metodo di Bray e King [5], modificato da Del Vecchio e D'Arca Simonetti [7] e la ricerca della lipasi col metodo Cabral, modificato da Starr [19]. Il comportamento auxologico è stato studiato coltivando *A. tumefaciens* in un mezzo sintetico così costituito: saccarosio gr. 10; fosfato bisodico gr. 3,3; citrato diammonico gr. 18,5; ac. citrico gr. 2; ac. glutamico gr. 10; asparagina gr 1; cloruro potassico mg. 7,6; cloruro di magnesio mg. 0,1; cloruro ferrico mg 0,25; cloruro di manganese mg. 0,18; acqua d. fino a 1000 cc. Tale liquido venne distribuito in

matraccini da 50 cc in ragione di 25 cc per ogni beutina. A parte le beute di controllo, in ognuna delle rimanenti veniva aggiunta una delle vitamine seguenti alle seguenti concentrazioni (in mg./cc): inositolo 12, Ca-pantotenato, tiamina, piridossina, riboflavina, niacina, ac. folico, P.A.B.: tutte 0,12; biotina 0,012; cianocobalamina 0,00001. Prove in triplo. L'apprezzamento dello sviluppo venne seguito per via nefelometrica. Rimanendo nel campo auxologico, sono state dosate alcune vitamine presenti in liquidi colturali sintetici nei quali era stato coltivato *A. tumefaciens* rispettivamente sensibile e resistente. Tali liquidi erano così costituiti: cloruro sodico gr. 5; solfato di magnesio gr. 0,2; fosf. bipotassico gr 1; citrato di sodio gr 2,77; asparagina gr 0,56; fumarato di sodio gr 10; glucosio gr 5; acqua d. fino a 1000 cc. Il dosaggio vitaminico è stato effettuato mediante i noti metodi microbiologici.

Le ricerche in vivo sono state condotte infettando con ceppi sensibili e resistenti un certo numero di piantine di ricino coltivate in serra a 30°C. e valutando i risultati attraverso l'esame dello sviluppo presentato dai tumori formatisi.

Risultati

La sensibilità di *A. tumefaciens* agli antibiotici adoperati è stata la seguente:

Antibiotici	Dosi (γ o U/cc)			
	10	100	1000	2000
ambramicina	+	+	+	+
aureomicina	+	+	+	+
terramicina	+	+	+	+
neomicina	—	+	+	+
vulcamicina	+	+	+	+
penicillina	—	—	—	+
tirotricina	—	—	+	+
bacitracina	—	—	—	+
streptomicina	—	—	—	+

Come si vede dalla risposta delle piastre di sensibilità, *A. tumefaciens* è risultato particolarmente sensibile all'ambramicina, aureomicina e terramicina; mediamente sensibile alla tirotricina e scarsamente sensibile alla bacitracina e streptomicina. Comunque sta di fatto che, sebbene a dosi sensi-

bilmente diverse, tutti gli antibiotici saggiati inibiscono il microrganismo e pertanto può venire indotta la resistenza, il grado finale della quale risultò il seguente:

ambramicina	500 γ/cc
aureomicina	500 » »
terramicina	500 » »
neomicina	500 » »
vulcamicina	2000 » »
penicillina	2000 U/cc
tirotricina	6000 γ/cc
bacitracina	8000 » »
streptomicina	8000 » »

Seguono i rilievi di alcune prove colturali e fisiologiche.

CARATTERI COLTURALI

A) In agar fagioli saccarosato, lo striscio presenta i seguenti caratteri:

controllo: bianco, liscio, lucente e mucoso
ambramicina: giallastro, liscio, lucente e mucoso
aureomicina: come ambramicina
terramicina: giallastro, liscio, lucente e molto mucoso
neomicina: bianco, liscio, meno lucente del contr., mucoso
vulcamicina: decisamente bianco, liscio, lucente e mucoso
penicillina: ialino, quasi raso, lucente, mucoso e poco tenace
tirotricina: bianco come vulcam., mucoso, lucente
bacitracina: bianco, molto meno mucoso del contr., quasi opaco
streptomicina: bianco, liscio, meno lucente e meno mucoso del contr.

B) - In brodo nutritivo:
controllo: sedimento abbondante e pellicola sottile, ma ben visibile
tutti gli altri ceppi: sedimento come nel controllo, pellicola però molto sottile o addirittura assente.

C) - In brodo di fagioli saccarosato:

controllo: sedimento e pellicola spessa e grinzosa
tutti gli altri ceppi: sedimento e pellicola sottile o assente.

Agglutinazione alla tripaflavina 1‰ - Negativa per tutti i ceppi.
Comportamento al Gram - Nessuna differenza tra i ceppi sensibili e resistenti.

Rilievi morfometrici - Sono state misurate 100 cellule per ogni ceppo ed i dati ottenuti elaborati statisticamente.

	lunghezza media dei microrgan. (in μ)	confronto tra le medie	differ. tra le medie	t	P(a)
controllo	3,07 ± 0,120	contr.-streptomicina	3,07—2,59 = 0,48	3,0	<0,01 °
ambramicina	2,34 ± 0,094	» -bacitracina	3,07—2,95 = 0,12	0,7	<0,5
aureomicina	3,84 ± 0,189	« tirotricina	3,07—2,36 = 0,71	4,2	<0,001°
terramicina	2,49 ± 0,118	» -penicillina	3,07—1,64 = 1,43	11,5	<0,001°
neomicina	1,95 ± 0,078	» -vulcamicina	3,07—3,40 = —0,33	1,8	<0,1
vulcamicina	3,40 ± 0,137	» -neomicina	3,07—1,95 = 1,12	7,8	<0,001°
penicillina	1,64 ± 0,030	» -ambramicina	3,07—2,34 = 0,73	4,7	<0,001°
tirotricina	2,36 ± 0,120	» -aureomicina	3,07—3,84 = —0,77	3,4	<0,01 °
bacitracina	2,95 ±0,100	» -terramicina	3,07—2,49 = 0,58	3,5	<0,01 °
streptomicina	2,59 ± 0,100				

(a) I dati segnati con ° sono significativi per P=0,01.

Dai risultati riportati possiamo dedurre quanto segue: prendendo come limite di significatività P=0,01, risulta che le differenze dimensionali dei ceppi antibiotico-resistenti rispetto al controllo sono risultate generalmente significative, registrandosi allungamenti od accorciamenti cellulari. Rispetto al controllo potremmo dire che, ad eccezione per la bacitracina, si osserva un accorciamento delle cellule nei riguardi di tutti gli antibiotici adoperati meno la vulcamicina e l'aureomicina le quali hanno invece tendenza a « filamentizzare ». Azione « accorciante » piuttosto sensibile è stata registrata per la penicillina quindi per la streptomicina.

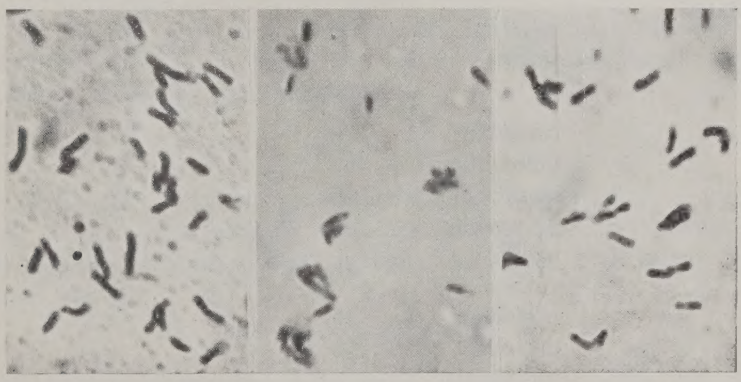

Fig. 1 *A. tumefaciens* (da sinistra): ceppo sensibile, ceppo penicillino e vulcamicino-resistente.

PROVE FISIOLOGICHE

Successivamente abbiamo rivolto la nostra attenzione alle più comuni prove di carattere fisiologico al fine di evidenziare un'eventuale diversità di risposta da parte di *A. tumefaciens* in rapporto alla resistenza. A tale scopo abbiamo saggiato il potere fermentativo, la amilolisi, la produzione di acidi, di acetil-metil-carbinolo, la riduzione dei nitrati, il comportamento in latte, la produzione di fosfatasi e di lipasi ed il comportamento auxologico. Ecco i risultati:

Fermentazioni: Glucosio, levulosio, maltosio, galattosio, lattosio, arabinosio e glicerina non vengono fermentati da nessuno dei ceppi.
Amilolisi: Negativa.
Produzione di acidi: Negativa.
Prod. di acetil-metil-carbinolo: Negativa.
Prod. di indolo: Negativa.

RIDUZIONE DEI NITRATI:

controllo	—	vulcamicina	±
ambramicina	—	penicillina	+
aureomicina	—	tirotricina	±
terramicina	—	bacitracina	—
neomicina	—	streptomicina	±

Comportamento in latte: Assenza di coagulo.
Fosfatasi: Tutti i ceppi risultano, senza notarsi differenze, produttori di fosfatasi.

LIPASI:

	al 3° g.	al 10° g.
controllo	+	+
ambramicina	+	+
aureomicina	+	+
terramicina	+	+
neomicina	+	+
vulcamicina	—	±
penicillina	+	+
tirotricina	+	+
bacitracina	+	+
streptomicina	—	±

I risultati ottenuti non provano lo stabilirsi di profonde differenze tra i vari ceppi, fatto solo eccezione, verosimilmente, per la riduzione dei nitrati e la lipolisi. Infatti, per quanto si riferisce alla prima, si nota una reazione decisamente positiva col ceppo penicillino-resistente ed a una reazione più debolmente positiva, ma pur sempre inequivocabilmente tale, nei ceppi tirotricino, streptomicino e vulcamicino-resistenti. Per quanto si riferisce alla lipolisi, osserviamo una ben più lenta e comunque più debole produzione di lipasi a proposito dei ceppi vulcamicino e streptomicino-resistenti.

Riguardo al comportamento auxologico diremo che tutti i ceppi, controllo compreso, si sono sviluppati normalmente indipendentemente dalla presenza o meno di vitamine nel mezzo. Ciò sta ad indicare l'habitus auxoautotrofico del microrganismo. Pertanto in mezzo sintetico, a suo tempo descritto, abbiamo dosato alcune vitamine eventualmente presenti limitandoci al controllo ed al ceppo streptomicino resistente.

Contenuti vitaminici del liquido colturale di *A. tumefaciens* sensibile e streptomicino-resistente (in γ/gr di cellule batteriche essiccate).

Vitamina	Ceppo sensibile	Ceppo resist.
biotina	0,00071	0,00121
Ca-pantotenato	5,1	4,3
niacina	4,5	6,0
piridossina	4,1	3,6
tiamina	3,6	3,9

La presenza di vitamine reperite nel mezzo colturale, sia pure concernenti soltanto il controllo ed il ceppo streptomicino-resistente, conferma l'auxoautotrofismo prima evidenziato.

Prove in vivo

Come appare dalla documentazione fotografica, dal risultato di due prove distinte ripetute a distanze di tempo, si osserva che non sussistono differenze, almeno nei riguardi degli antibiotici adoperati, tra il ceppo sensibile e quelli resistenti.

Discussione dei risultati

Sebbene il meccanismo della genesi dell'antibiotico-resistenza sia ancora ben lungi dall'essere chiarito, tuttavia possiamo affermare come dato

acquisito che si possono registrare variazioni più o meno sensibili nell'ambito morfo-fisiologico del microrganismo in rapporto alla resistenza o meno. Riferendoci ai caratteri esaminati nei riguardi di *A. tumefaciens*, diremo che anch'esso mostra un qualche cambamento in rapporto alla resistenza acquisita. Cominciamo anzitutto a sottolineare il diverso grado di resistenza raggiunto da *A. tumefaciens* verso gli antibiotici adoperati. Tale grado di resistenza risulta in rapporto alla sensibilità del germe verso le sostanze antibatteriche impiegate, apparendo molto elevato per la streptomicina e

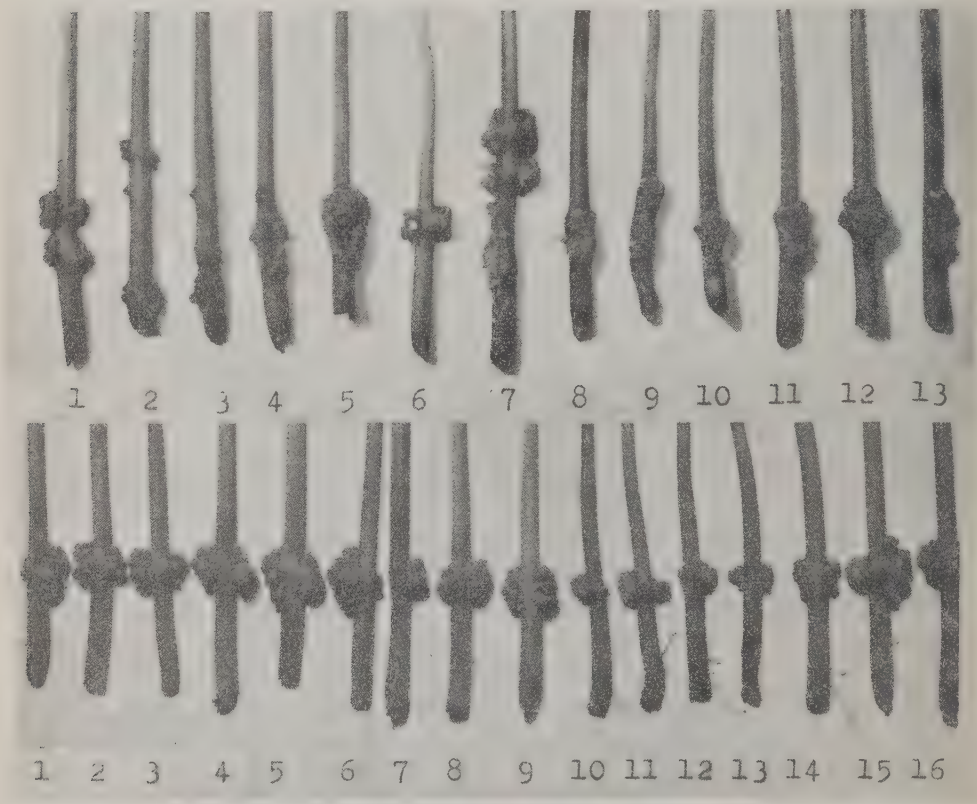

Fig. 2 Tumori da *A. tumefaciens* sensibile ed ant.-resistente in piante di ricino.
In alto (prima prova), da sinistra, nn. 1, 2, 3: controllo: 4, 5, 6: penicillina; 7: tirotricina; 8, 9, 10: streptomicina; 11, 12, 13: bacitracina.
In basso (seconda prova), da sinistra nn. 1, 2, 3, 4: controllo; 5, 6, 7: bacitracina; 8, 9, 10: streptomicina; 11, 12, 13, 14: vulcamicina; 15, 16: neomicina.

la bacitracina, seguite dalla penicillina e vulcamicina, mentre per l'aureomicina, terramicina e neomicina non è stato possibile superare la dose di 500 γ/cc.

I caratteri colturali hanno dimostrato una certa gamma di variazioni concernenti la lucentezza, la mucosità, la tenacità, ecc. delle vegetazioni sui mezzi solidi, mentre per quelli liquidi è da sottolineare la mancata formazione o quasi di pellicola in contrasto con i controlli nei quali questa è sempre ben sviluppata. La perdita di lucentezza già si trova segnalata in letteratura (sempre a proposito dell'antibiotico-resistenza) nei riguardi di gonococchi e meningococchi penicillino-resistenti ([13], [1]), come pur l'assenza di muco fu riscontrata da STUBBLEFIELD ([20]) in un ceppo particolare di *E. coli*. Il comportamento al Gram si è mostrato uniforme in tutti i ceppi, per quanto variazioni siano già state riscontrate da altri, con relativa facilità, su altri microorganismi resistenti (RAKE e Coll. ([16]), BELLAMY e KLIMEK ([3]), MC VEIGH e HOBDY ([12]), BARBER ([2]) I risultati dei rilievi morfometrici ci sembrano rivestire in certo interesse in quanto, mentre relativamente comune è l'allungamento della cellula in seguito alla resistenza microbica - o comunque al contatto germe-antibiotico — (SMITH e HAY ([18]), BLAIR ([4]), NAITO ([15]), e Coll.) ben più raro è invece lo accorciamento della cellula stessa, quale da noi riscontrato del ceppo penicillino-resistente.

Tra le prove di carattere fisiologico, degna di nota è la marcata differenza tra i ceppi sensibili e resistenti nel comportamento verso i nitrati. Infatti, mentre il ceppo sensibile non ha capacità riduttive, si osserva formazione di nitriti da parte del penicillino-resistente nonchè, seppure in modo minore, in quello tirotricino, streptomicino e vulcamicino-resistente. Una logica spiegazione del fenomeno sarebbe stata, se non facile, almeno intuibile se fosse avvenuto il contrario, vale a dire se i ceppi resistenti avessero perduto la capacità NO_3- riduttrice rispetto al ceppo originale, come ad es. osservarono MC VEIGH e HOBDY (op. cit.) in ceppi di stafilococchi antibiotico-resistenti. In tal caso poteva invocarsi un danneggiamento più o meno sensibile del sistema enzimatico preposto a tale funzione metabolica. Nel nostro caso, al contrario, le ragioni di tale comportamento ci sembrano di natura complessa e forse imputabili a fenomeni collegati al potenziale ossido-riduttivo protoplasmatico.

Mentre niente è da osservare riguardo al comportamento auxologico, crediamo opportuno soffermarci sopra le prove in vivo in quanto non abbiamo notato un abbassamento della virulenza da parte del patogeno come invece era da aspettarsi conforme la numerosa letteratura su analoghi argomenti. I nostri risultati concordano invcee con quelli di DE ROPP (op. cit.)

il quale operando con 5 ceppi di *A. tumefaciens* avente diverso grado di resistenza naturale a diversi antibiotici (ad es. per la penicillina si andava da un minimo di 4 γ/litro fino a 1000 γ/litro), osservò che il potere cancerigeno del patogeno non era correlato all'antibiotico-resistenza. Si potrebbe tuttavia obbiettare che la resistenza di quei ceppi era naturale, mentre il nostro *A. tumefaciens* è stato reso artificialmente resistente. L'identico comportamento dei nostri microrganismi sembra confutare l'obbiezione e ci autorizzerebbe a pensare che l'antibiotico-resistenza, sia questa naturale od acquisita, non danneggia in *A. tumefaciens* il potere patogeno.

Sarebbe molto interessante dedurre una spiegazione di tale fatto, ma purtroppo non essendo chiaro fino ad oggi il meccanismo della patogenicità di *A. tumefaciens*, ne consegue che niente si può dire intorno a fenomeni ad essa collegati.

Conclusioni

Dalle prove comparative eseguite in questo lavoro, tra *A. tumefaciens* sensibile ed antibiotico-resistente, le differenze riscontrate sembra non siano di notevole e significativo rilievo. Infatti, se si eccettuano i dati morfometrici, il comportamento nei riguardi della riduzione dei nitrati e, in misura minore, della lipolisi, non abbiamo notato altre differenze. Tanto, è evidente, per quanto concerne le prove eseguite.

Circa, infine, l'esito delle prove in vivo, queste investono il problema della virulenza in rapporto all'antibiotico-resistenza; ma lo stesso problema non può essere discusso, per la sua complessità, in base ai dati qui raccolti.

Riassunto — *E' stata eseguita una serie di prove morfo-fisiologiche su* Agr. tumefaciens *sensibile ed antibiotico-resistente. I risultati ottenuti non depongono a favore di profonde differenze in rapporto alla resistenza. Infatti, se si eccettuano i rilievi morfometrici, la riduzione dei nitrati e la lipolisi, altro non è dato da osservare a tale riguardo. Circa le prove di patogenicità in vivo, non si osservano differenze nella virulenza del patogeno in rapporto alla resistenza.*

Bibliografia

(1) - Abo El Dahab, Mostafa and Cox, Carrol, E.: *Studies of certain nutritional requirements of chloromycetin-resistent, chloromycetin-susceptible pathogenic and non pathogenic isolates* of Pseudomonas solanacearum. Phytopath., 47, 1, (1957)

(2) - Baber, M. - *J. Gen. Microbiol.*, 8, 111, (1953). (Cit. da Schnitzer, R. J. and Grunberg, E.: *Drug Resistance of Microorganisms*, N. Y. 1957).

(3) - Bellamy, W. D. and Klimek, J. W.: *Some properties of penicillin-resistant staphylococci.* J. Bacteriol., 55, 153, (1948).

(4) - Blair, J. E. et al. - *J. Immunol.*, 52, 281, (1946). (Cit. da Schnitzer).

(5) - Bray, J. and King, E. J.: *The phosphatase reaction as an aid to the identification of microorganisms using phenolphtalein phosphate as substrate.* J. Path. Bact., 55, 315, (1953).

(6) - Dawson, W. J.: *Plant Diseases due to Bacteria.* Cambridge, (1957).

(7) - Del Vecchio, V. e D'Arca Simonetti, A.: *Modifica pratica del metodo di Bray e King per la ricerca della fosfatasi microbica.* Nuovi Ann. Ig. e Microb., *XI*, n. 2, 123, (1960).

(8) - De Ropp, S. R.: *The action of antibacterial substances on the growth* of Ph. tumefaciens *and of crown gall tumor tissue.* Phytopath., 39, 722, (1949).

(9) - English, A. R. and van Halsema, G. A.: *Note on the delay in the emergence of resistant* Xanthomonas *and* Erwinia *strains by the use of streptomycin plus terramycin combinations.* Plant Disease Reporter, 38, 429, (1954).

(10) - Franke, E. and Roehl, W. - *Berlin. klin. Wochsckr., 44*, 233, (1907). (Cit. da Schnitzer).

(11) - Klemmer, H. W. et al.: *Inibition of crown gall by selected antibiotics.* Phytopath., *45*, 618, (1955).

(12) - Mc Veigh, J. and Hosdl, C .J. - *Am. J. Botany*, 39, 352, (1952). (Cit. da Schnitzer).

(13) - Miller, C. P. and Bohnhoff, M. - *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 60, 354, (1945). (Cit. da Schnitzer).

(14) - Miller, C. P. and Bohnhoff, M. - J. *Infections Diseases*, *81*, 147, (1947). (Cit. da Schnitzer).

(15) - Naito, N. - *J. Antibiotics*, 5, 404, (1952). (Cit. da Schnitzer).

(16) - Rake, G. et al. - *J. Immunol.*, *48*, 271, (1944) .(Cit. da Schnitzer).

(17) - Rangswami, G.: *Development of resistence to streptomycin in* X citri *and* X. Malvacearum. Cur. Sci., 26, 185, (1957).

(18) - Smith, L. D. and Hay, T. - *J. Franklin Inst.*, 233, 598, (1942). (Cit. da Schnitzer).

(19) - Starr, M. P. - *Science*, 93, 333, (1941). (Cit. da Dawson, op. cit.).

(20) - Stubblefield, E.: *A morphological variant of* E. coli *and its resistance to streptomycin.* J. Bacteriol., *54*, 569, (1947).